

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (СПбГУ)

Физический факультет

Направление «Физика»

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров



**«Исследования агрегатов прионного белка Sup35
методами сканирующей туннельной микроскопии и
поверхностно-усиленной иглой рамановской
спектроскопии»**

Выпускная квалификационная работа студента 4 курса:

_____ **Насртдиновой Анжелики Альфридовны**

Научный руководитель:

_____ канд. ф.-м. н., ассистент **Соколов П.А.**

Рецензент:

_____ канд. биол. н., стаж. исслед. **Белоусов М.В.**

Санкт-Петербург

2017

Оглавление:

1. Введение	3
2. Обзор литературы:	
2.1 Прионы и амилоиды	5
2.2 Структура прионного белка Sup35	8
2.3 Фактор [PSI+]	10
2.4 Модели структурной организации агрегатов Sup35	11
3. Методы исследования прионного белка Sup35:	
3.1 Атомно-силовая микроскопия (AFM).	12
3.2 Сканирующая туннельная микроскопия (STM).	14
3.3 Поверхностно-усиленная иголка рамановской спектроскопии (SERS) и зондово-усиленная иголка рамановской спектроскопии (TERS).	16
4. Цель работы	19
5. Материалы и методы.	20
6. Результаты и их обсуждение:	
6.1 Исследования с помощью АСМ и СТМ	21
6.2 Исследования с помощью ПУРС	30
Выводы	43
Список используемой литературы	44

1.Введение:

В начале 18 века в Великобритании были зарегистрированы случаи необычного поведения овец на фермах. Животные страдали от сильного зуда и постоянно тёрлись о деревья и заборы. На протяжении долгого времени было не понятно, что же на самом деле является главной причиной столько необычного поведения домашнего скота. Вклад в изучения внес Бёрн Сигурдсон, который в 1933 году начал изучать столь редкое неизвестное ранее заболевание. Он пришел к выводу, что главной причиной данной болезни являются медленные инфекции и выделил несколько главных отличий: продолжительность инкубационного периода, характерные пораженные части организма, медленное развитие инфекции и следствие всего этого- летальный исход. Позже выяснилось, что это были первые случаи- почесухи овец или скрейпи. Такие же похожие симптомы были обнаружены и у другого домашнего скота- коров, они в свою очередь страдали бешенством. Все эти заболевания позже отнесли к классу трансмиссивной губчатой энцефалопатии. В середине 20 века К. Гайдусек и В. Зигас описали болезнь известную среди горных племен форе- «куру» (в пер.- «дрожь»), которую изучали на восточной части острова Новая Гвинея. Жители этих мест вместе со своими детьми практиковали обычаи ритуального каннибализма, употребляя в пищу мозг умерших предков без специальной обработки, тем самым отдавая признательность умершим. Таким путем и происходило заражение. Выявленные клинические проявления заболевания и картина морфологических поражений помогли провести аналогию с заболеванием скрейпи, поэтому сделали вывод о том, что медленные инфекции способны поражать не только животных, но и человека [1,2,3]. На протяжении долгого времени склонялись к тому, что медленная инфекция всё-таки вызваны вирусами, так как она имела очень сходные проявления.

Картина «медленных инфекций» стала ясной после совершенного открытия Стенли Прузинером в 1980-х годах. Прузинеру удалось открыть новый класс инфекции, которая отличается от вирусов и бактерий по многим признакам. Инфекционный агент нового типа получил название прион. Прион-приобретенный или наследуемый фактор, обладающий белковой природой, имеющий нестандартную третичную структуру и характеризующийся отсутствием нуклеиновых кислот [6]. Но самое важное, что прионы являются возбудителями нейродегенеративных болезней не только у животных, но и у человека. На данный момент наиболее известными из них являются болезнь Крейтцфельда-Якоба, фатальная семейная бессонница, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера. Открытие Прузинера позволило выделить новый класс заболеваний млекопитающих и людей. Эти заболевания относятся к «конформационным», в основном поражают нервную систему и головной мозг и провоцируются нарушением образования пространственной структуры определенного количества белков [4]. Заболевания бывают наследственными (13% случаев) и приобретенными (менее 1% случаев), но больший процент принадлежит спорадическому способу заражения (87% случаев), также не исключены случаи инфекционного способа заражения, что впервые было показано Р. Чандлером, проводившим опыты над мышами. Ему удалось заразить лабораторных грызунов болезнью, которой страдают овцы-скрейпи, путем введения в мозг здорового животного гомогената мозга зараженного-интраперитонеально или интрацеребрально [5].

Прионные заболевания приводят к летальному исходу и в настоящее время являются неизлечимыми. Агрегация прионных белков является причиной различных заболеваний, связанных с ними. На сегодняшний день сведения и знания о структуре различных типов агрегатов прионов весьма ограничены. Следовательно, сами прионы и исследования их структур вызывают большой интерес в современном мире во многих областях наук.

2.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:

2.1 Прионы и амилоиды

Большой вклад в изучение «медленных инфекций» внес в начале 1980-х годов американский профессор неврологии и биохимии из Калифорнийского университета в Сан-Франсиско Стенли Прузинер. Он совместно с группой ученых и соавторов, выделил и очистил инфекционный агент, обладающий белковой природой, из мозга овец, болеющих скрейпи. В последующем инфекционный агент получил название прион (Prion Protein) – PrP. Используя первичную структуру Prp, был также найден соответствующий ген, кодирующий его- Prnp. Неприонная форма носит обозначение- PrP^c, прионная изоформа- PrP^{sc}. Prion Protein - мембранный белок, находящийся в центральной нервной системе и в лимфотканях и закреплен на внешней стороне клеточной мембраны с помощью гликозил-фосфатидилинозитола (рис. 2.1.1). На протяжении долго времени считалось, что агент, который вызывает у овец заболевание является вирусом, но данная гипотеза была опровергнута так, как ряд экспериментов показал, что прионы нечувствительны к нуклеазам. Также в ходе проведенных экспериментов было выявлено, что в присутствии кислорода, данный белковый инфекционный агент очень чувствителен к ионизирующей радиации, устойчив к нагреванию, сохраняет свою активность после обработки мочевиной, хаотропными солями, SDS, протеиназой К, и агентом, который, как и нуклеаза повреждает ДНК- псораленом [7,8,20,33].

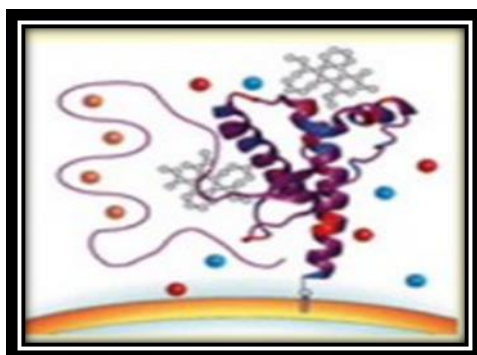


Рис. 2.1.1 В норме закрепленный белок PrP на внешней клеточной мембране [45]

Прионы- инфекционные агенты белковой природы, имеющие аномальную третичную структуру: преобладание β -слоёв- его патологическая форма PrP^{sc} содержит 30% α -спиралей и 43% β -структур. Соответственно, различия между PrP^c и PrP^{sc} обусловлены строением вторичной структуры, а аминокислотная последовательность малоразличима. В нормальной форме практически нет β -структур, она обогащена α -спиральными участками [18,20]. Отсутствие нуклеиновых кислот в составе прионов так же было подтверждено экспериментальными способами. Из которых стало понятно, что инфекционным началом являются не нуклеиновые кислоты, а белки, так как свойства, описанные выше для прионов, были характерны также и для мономеров белков [17].

Фундаментальный интерес представляет механизм распространения прионов, который состоит в том, что белок в прионной форме способен запускать так называемую «цепную» реакцию, таким образом он изменяет укладку такого же белка в себе подобный. Новый способ копирования информации, «записанный» в трехмерной структуре белка. Прионы распространяются путем наложения их конформации на нормальные клеточные белки, приводящие к образованию агрегатов (штаммов) и, в конечном счете, к нейродегенерации [6]. Изменении конформации белка PrP в неприонной форме обусловлено образование большого количества β -листов. Поэтому образование различных штаммов одним и тем же прионным белком с одной и той же первичной последовательностью вызывают научный интерес. Зараженные белки PrP с различными конформациями, размножаясь, влекут за собой разницу в течении прионных заболеваний, таких как: клинические проявления, повреждения разных участков головного мозга и тканей, возможность различных инкубационных периодов. Разнообразие штаммов непосредственно связано с амилоидами, которые могут принимать различные конформации и вырабатывать различные фенотипы [16,30]. Агрегация прионных белков и является одной из основных причин

возникновения заболеваний, вызванных прионами. Инфекционная форма прионов, амилоидных агрегатов, и существует в виде различных штаммов. Считается, что штаммы представляют структурно различные конформации молекулы прионного белка, которые упакованные в агрегаты амилоида, но знания о структуре различных типов агрегатов ограничены [24].

Общие черты патогенеза в прионных заболеваниях такие, как гибель нейронов и отложение амилоидов. На существование общих механизмов, которые приводят к изменениям нейронов и их гибели, привело сходство патологической картины мозга при прионном заболевании и при болезни Альцгеймера [44].

Амилоиды отлагаются в разных органах и тканях в результате наследственного или приобретенного нарушения сворачивания некоторых белков. Амилоиды- белковые агрегаты, которые образуют неразветвленные упорядоченные фибриллы. Амилоидные протофибриллы, образуемые в следствии присоединения мономеров к олигомеру, объединяются в фибриллы и амилоидные агрегаты. Образование многочисленных β -слоев отдельными молекулами белков формируется за счет межмолекулярных водородных связей (рис. 2.1.2) [32].

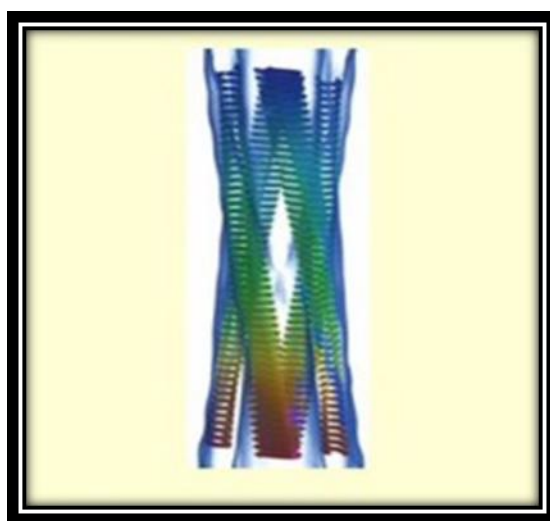


Рис. 2.1.2. Модель амилоиды [45].

Амилоиды, как и прионы, устойчивы к протеазам. Они способны сами катализировать свой рост, поэтому, их накопление в организме человека ведет к разрушению структуры и к разрушению функционированию органов и тканей, что приводит к заболеваниям. На данный момент известно около 20 нейродегенеративных заболеваний, наиболее распространенными являются: болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хаттингтона. Амилоидные болезни относятся к «конформационным» заболеваниям и вызваны нарушением процессов формирования пространственной структуры некоторых белков, приводящих к изменениям клеточной физиологии [39].

Амилоиды, как и прионы способны сами катализировать собственный рост, тем самым накапливаться и вызывать заболевания, связанные с нарушением пространственной структуры белков. Прионы в свою очередь являются инфекционными факторами белковой природы, которые размножаются путем наложения их конформаций на неинфекционный белок и меняя его укладку в себе подобный. Амилоиды, в свою очередь, являются способом укладки белка, при котором он приобретает поперечную бетта-структуру за счет формирования межмолекулярных упорядоченных бета слоёв. Численность амилоидов растет за счёт присоединения свободных мономеров к протофибрилле. При присоединении мономера к амилоидной протофибрилле, он изменяет ее конформацию, что зачастую приводит к инактивации белка, или к приобретению новых функций.

2.2 Структура прионного белка Sup35

Прионный белок дрожжей Sup35 (eRF3) относится к семейству *Saccharomyces cerevisiae*. Модельная система Sup 35 широко используется для изучения прионов, их структур и агрегатов. Это связано с тем, что прионы дрожжей не приводят к гибели клеток и безопасны для постановки экспериментов.

Прионный белок Sup35 состоит из трех основных районов- N, M, C (рис. 2.2.1) [9].

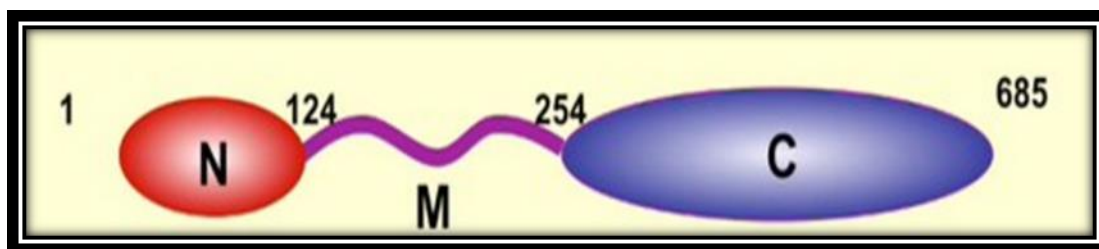


Рис. 2.2.1 Белок Sup35 [45]

N домен (1-123 а.к.)- амиконцевой, содержащий более 50% глутаминовых и аспаргиновых аминокислотных остатков. Данный район необходим для поддержания прионного состояния, его еще также называют - PrD (Prion forming Domain), в нем размещены все мутации в гене Sup35. Переход этого домена в прионное состояние приводит к агрегации Sup35. Аминоконцевой район полимеризуется в клетках [PSI+]. С точки зрения функций для физиологии клетки N-район остается неизвестным [10].

Заряженный срединный район M (124- 253а.к.) функции которого до конца не выяснены, как и для аминоконцевого домена, содержит в себе более 40% глутаминовой кислоты и лизина. Главной выясненной функцией срединного района является его участие в обеспечении стабильности фактора [PSI+] [11].

Третий из основных район прионного белка Sup35 обозначается C (254-685 а.к.)- карбоксиконцевой, жизненно-важный для Sup35. Его главная функция- обеспечивать функции белка в терминации трансляции [41].

Таким образом Sup35- ГТФ-связывающий белок способствует терминации трансляции (процесс синтеза белка из аминокислот). Терминационные свойства снижаются при переходе N домена в прионное состояние.

Очищенный рекомбинантный Sup35, состоящий полностью из трех районов, или фрагмент Sup35, содержащий только M и N, способны образовывать амилоидные фибриллы in vitro. Образованные фибриллы

имеют схожую структуру с фибриллами, сформированными из пептида A β , которые участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера (рис. 2.2.2) [31].

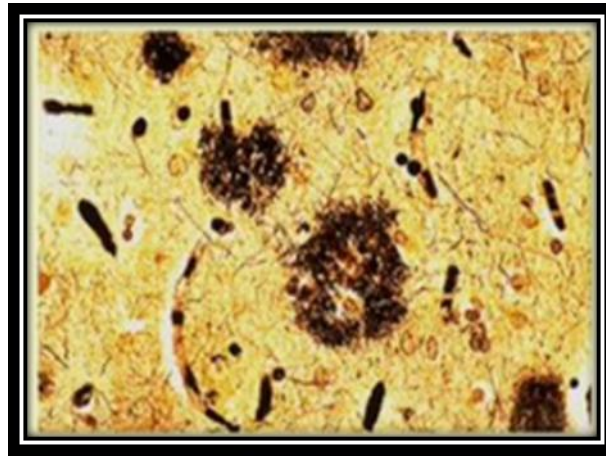


Рис. 2.2.2 Амилоидные бляшки Альцгеймера [45].

2.3 Фактор [PSI+]

Р. Викнер описал два наследуемых детерминанта дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [URE3] и [PSI+], используя концепцию прионов [19]. Детерминант [PSI+] удовлетворяет всем генетическим критериям приона дрожжей. Детерминант [PSI+] изначально был представлен как фактор, который приводил к увеличению эффективности слабого оксисупрессора SUQ5, после было выяснено, что [PSI+] увеличивает эффективность прочтения всех трех нонсенс кодонов [27]. Прионная форма [PSI+] поддерживается при наличии гена Sup35. Из всех известных и исследованных прионных дрожжей [PSI+] изучен лучше остальных. В связи со способностью белка Sup35 переходить в стабильное прионное состояние существует и фенотип [PSI+]. Было также показано, что срединный район М прионного белка Sup35 участвует в обеспечении стабильности фактора [PSI+], а аминоконцевой домен полимеризуется в клетках [PSI+] [28]. Детерминант [PSI+], передающийся с помощью цитодидукции, наследуется по неменделеевскому типу, и находится в цитоплазме клетки [35]. Также у [PSI+] показаны барьеры межвидовой трансмиссии [15]. Фактор [PSI+] представляет собой форму фактора терминации трансляции Sup35 [12].

2.4 Модели структурной организации агрегатов Sup35

Фибриллы, образованные Sup35 *in vitro*, имеют сходную структуру с амилоидами. Структура амилоида состоит из β -листов, которые в свою очередь перпендикулярны оси самой фибриллы, а вдоль этой оси сосредоточены водородные связи, которые соединяют полипептидные цепи [21].

На основе экспериментальных данных были предложены два типа структурных моделей фибрилл: β -спирали и супер-складчатой β -структуры. В первой модели β -слои, образованные N-доменом Sup35, укладываются по спирали, образуя полые цилиндры, а отдельные мономеры в фибриллу через крайние регионы N-района [29].

Разногласие β -спиральной модели с супер-складчатой β -структурой обнаруженное твердотельным методом ЯМР, делает эту модель маловероятной [43]. Нынешние данные свидетельствуют в пользу супер-складчатой модели β -структур, в которой β -слои ориентированы перпендикулярно оси самой фибриллы, а отдельные мономеры, связанные водородными связями, параллельно (рис. 2.4.1). Эти водородные связи образуются между заряженными аминокислотами, находящимися в «регистре», один поверх другого, создавая массив удлинённых параллельных β -листов, каждый из которых состоит из одинаковых нитей и выровнен с осью фибриллы. β -нити образуют так называемую кросс- β -структуру, которая проходит перпендикулярно оси фибриллы. В то же время нет четких данных о точном положении областей β -нитей и поворотов. Эта неопределенность может отражать пределы экспериментальных подходов, но также может быть связана со структурным полиморфизмом фибрилл Sup35p. Различные формы фибрилл Sup35p могут включать разные области N-домена [38,46].

Несмотря на прогресс в понимании структурного расположения фибрилл, связь между структурой фибрилл и свойствами [PSI+] все еще остается неустановленной.

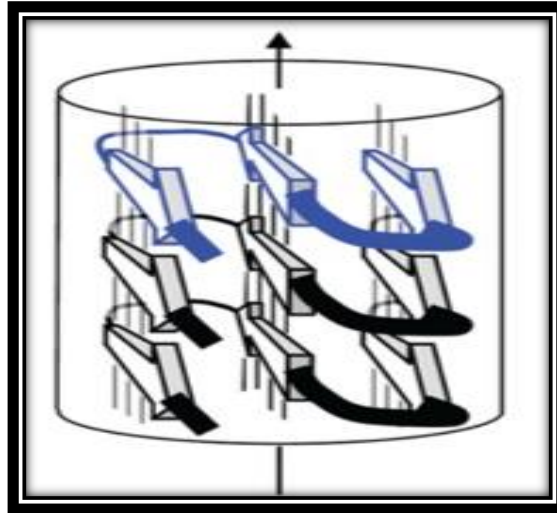


Рис. 2.4.1 Модель супер-складчатой β -структуры [46]

3. Методы исследования прионного белка Sup35

3.1 Атомно-силовая микроскопия (AFM)

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) относится к семейству сканирующей зондовой микроскопии, используется для изучения рельефа поверхности с высоким разрешением. С помощью него можно исследовать как проводящие, так и непроводящие поверхности, наличие вакуумных условий необязательно.

Принцип работы АСМ: с поверхностью исследуемого образца контактирует зонд- тонкое острие, которое прикрепляется к концу гибкого кантилевера (консоль) (рис. 3.1.1). Это силовое взаимодействие и регистрирует атомно-силовой микроскоп. Кантилевер начинает изгибаться в результате действующей силы со стороны поверхности на иглу. Соответственно, наличие у изучаемого рельефа различных неровностей: возвышенностей или впадин; приводит к изменению силы, действующей на зонд, и изменению изгиба консоли. Тем самым определение рельефа поверхности проводится с помощью регистрации изменения величины

изгибы кантилевера. Изменения величины изгиба регистрирует оптическая система, состоящая из лазера и фотодиода. Между иглой и образцом возникают силы Ван-дер-Ваальса- силы притяжения на дальних расстояниях и силы отталкивания при сближении.



Рис. 3.1.2 Схематическое изображение кантилевера в АСМ

В зависимости от характера Ван-дер-Ваальсовых сил существуют три режима работы АСМ (рис. 3.1.2).



Рис. 3.1.2 Режим работы в зависимости от Ван-дер-Ваальсовых сил.

Контактный режим- острая игла и поверхность образца находятся в непосредственном контакте. Сила взаимодействия поддерживается на постоянном уровне с помощью системы обратной связи, в следствие чего изменяется расстояние между образцом и зондом. Бесконтактный режим- нет никаких контактов между образцом и иглой. Обратная связь поддерживает постоянной амплитуду сканирующего зонда и записывает изменения частот и фаз колебаний. «Полуконтактный» режим- промежуточный способ сканирования между двумя предшествующими. Происходит колебание

кантилевера, и он касается поверхности образца, при этом система обратной связи поддерживает постоянной амплитуду колебаний [13].

3.2 Сканирующая туннельная микроскопия (STM)

Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ) появился первым в семействе зондовых. Как и атомно-силовой микроскоп СТМ предназначен для измерения поверхности образцов с высоким пространственным разрешением, но поверхности должны быть проводящими. СТМ состоит из: зонда (металлической иглы), регистрирующей системы и системы перемещения иглы относительно исследуемой поверхности по двум или трем координатам.

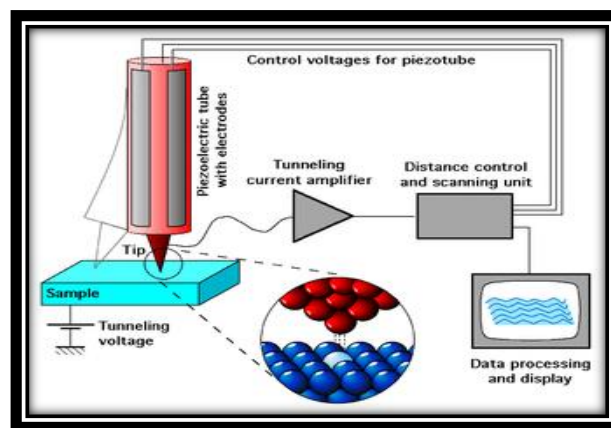


Рис. 3.2.1 Схематическое изображение СТМ

Принцип работы основан на том, что во внешнем электрическом поле между тонкой металлической иглой и исследуемой поверхностью туннелируют электроны в зависимости от полярности напряжения через узкий потенциальный барьер (рис. 3.2.1). Металлическая игла подводится к поверхности образца на расстоянии в несколько ангстрем. Туннельный ток, величина которого экспоненциально зависит от расстояния образец-зонд, возникает при приложении разности потенциалов. С помощью данных полученных об изменении туннельного тока и проводится визуализация поверхности. Экспоненциальная зависимость туннельного тока от расстояния осуществляет возможность регулировать расстояние между зондом и исследуемой поверхностью с высокой точностью. Система обратной связи

способствует поддержанию величины туннельного тока между поверхностью и металлической иглой на определенном уровне. С помощью пьезоэлектрического элемента осуществляется контроль величины тока и расстояние зонд-поверхность, в то время как сам зонд сканирует вдоль оси Z .

Изображение поверхности в сканирующем туннельном микроскопе осуществляется двумя способами: постоянным туннельным током и постоянной высотой. При осуществлении первого метода металлическая игла совершает растровое сканирование вдоль поверхности исследуемого образца и изменение напряжения на Z - электроде в цепи обратной связи записывается и воспроизводится в компьютере. Во втором случае $Z = \text{const}$ и зонд перемещается над образцом на определенном расстоянии. В качестве изображения регистрируется изменения туннельного тока. Метод постоянных высот весьма удобен для сканирования атомарно гладких поверхностей [13, 22].

В нашей работе мы использовали научно-исследовательскую платформу «Нанолаб», которая состоит из двух модулей: Prevac – VG Scienta и Omicron (рис. 3.2.2). Данные модули являются независимыми установками для экспериментов так, как они соединены для того, чтобы осуществлять передачу образцов между ними без нарушения сверхвысоковакуумных условий. В модуле Omicron реализуются методы исследования сканирующей туннельной микроскопии и атомно-силовой микроскопии.

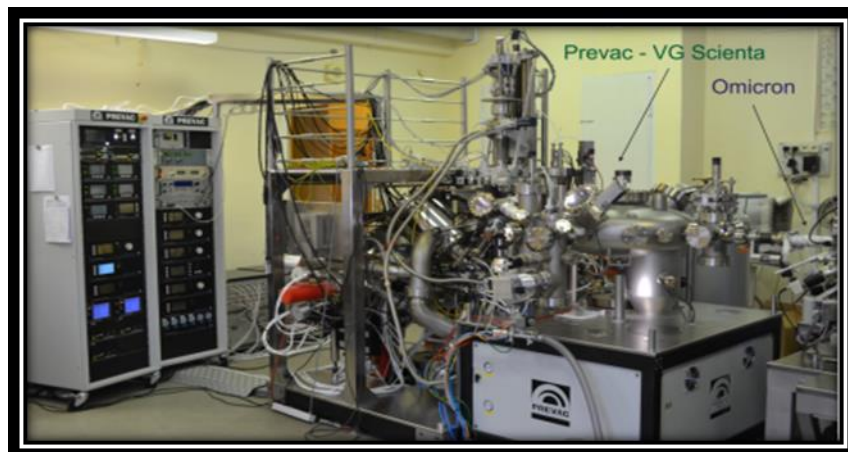


Рис. 3.2.2 Общий вид научно-исследовательской платформы «Нанолаб»

С помощью сканирующей туннельной микроскопии был исследован и предложен способ сборки олигомеров амилоид, участвующих в патогенезе болезни Альцгеймера. Предположенная модель сборки олигомера протекает в несколько стадий. В начале А β подвергается конформационным изменениям, включая упорядочивание β -структуры. Далее, концы мономеров А β объединяются своими концами с образованием димеров и олигомеров [47]. Кроме того, с помощью СТМ были исследованы сборки А β 42, которые обеспечивают информацию на молекулярном уровне о структурах агрегатов [49]. Также на основании данных, полученных с помощью СТМ, были охарактеризованы β - структуры амилоидных фибрилл человека и крысы [50].

В данной работе мы попытались изучить агрегаты прионного белка Sup35 с помощью сканирующей туннельной микроскопии.

3.3 Поверхностно-усиленная иголка рамановской спектроскопии (SERS) и зондово-усиленная иголка рамановской спектроскопии (TERS)

TERS- это технология, которая позволяет одновременно получать топографические и рамановские изображения с пространственным разрешением. В основе рамановской спектроскопии лежит способность изучаемых образцов к комбинационному или рамановскому рассеянию монохроматического света. Данный вид спектроскопии является эффективным методом изучения веществ так, как комбинационное рассеяние наблюдается в рассеянном свете от изучаемой системы, а не в спектре поглощения. В связи с этим рамановская спектроскопия имеет ряд преимуществ: облегчается процесс измерения в различных агрегатных состояниях среды, можно также использовать прозрачные материалы, не требуется предварительной подготовки образца.

Металлический наконечник облучают лазерным светом с определенной длиной волны перед тем как его подводят к исследуемому образцу на

расстоянии приблизительно в 1-2 нм. Луч света при контакте с образцом рассеивается. Типичный подход в эксперименте TERS заключается в фокусировке лазерного луча на металлическом наконечнике с поляризованным по оси наконечника светом с последующим сбором рассеянного света, рассеянного на поверхности, от образца в зоне усиления наконечника с помощью оптики.

SERS является поверхностно-чувствительным методом, который усиливает комбинационное рассеяние на молекулах, адсорбированных на шероховатых металлических поверхностях или наноструктурах.

Точный механизм метода SERS по-прежнему до конца не выяснен. Существуют две основные теории: электромагнитная и химическая, их механизмы существенно различаются. В электромагнитной теории предполагается возбуждение локализованных поверхностных плазмонов, а в химической образование комплексов переноса заряда. Химическая теория применяется только для тех молекул, которые образовали химическую связь с поверхностью, поэтому она не может объяснить наблюдаемое усиление сигнала, тогда как электромагнитная теория может применяться даже в тех случаях, когда образец физадсорбируется только с поверхностью. Было показано, что усиление SERS может происходить даже если молекула расположена относительно далеко от поверхности, на которой размещены металлические наночастицы, обеспечивающие явления поверхностных плазмонов. Таким образом, это наблюдение стало свидетельствовало в пользу электромагнитной теории SERS. Исследования в 2015 году на более мощном расширении технологии SERS под названием SLIPSERS (Slippery Liquid-Infused Porous SERS) также свидетельствовали в пользу этой теории [51].

SERS можно проводить в коллоидных растворах. Также распространенным методом является осаждение жидкого образца на поверхность кремния или стекла с наноструктурированной поверхностью благородного металла. В то

время как первые эксперименты проводились на электрохимически шероховатом серебре, теперь поверхности часто готовят, используя распределение металлических наночастиц на поверхности. Наиболее распространенными металлами, используемыми для плазмонных поверхностей, являются серебро и золото. Также недавно был изучен в качестве альтернативного плазмонного материала алюминий [23].

Сущность явления комбинационного или рамановского рассеяния (неупругое рассеяние на молекулах веществ, происходит с изменением частоты излучения) рассматривается с двух точек зрения: классической теории и квантовой. В случае классической теории картина явления более упрощенная: электрическое поле света создает дипольный момент частицы, колеблющейся с частотой сходной по значению с частотой падающего света. Молекула испускает излучение при изменении дипольного момента. Сдвиг частоты испускания обусловлен эффектом Доплера, в следствии движения источника света.

В квантовой теории излучение рассматривается как поток фотонов, рассеивающихся при столкновении с частицами. Столкновение может быть, как упругим (рэлеевским), так и сопровождать обменом энергии между фотоном и частицей, которая может либо потерять энергию, или наоборот ее приобрести [25].

В нашей работе были проведены измерения на приборе Интегра Спектра (рис. 3.3.1). Он предназначен для определения молекулярного состава пленок, наноструктур, наноустройств, частиц, поверхностных структур, комплексного исследования физических и оптических свойств поверхности, получения изображения образцов по их спектрам комбинационного рассеяния, люминесценции и ближнепольного излучения с пространственным разрешением в наномасштабе.

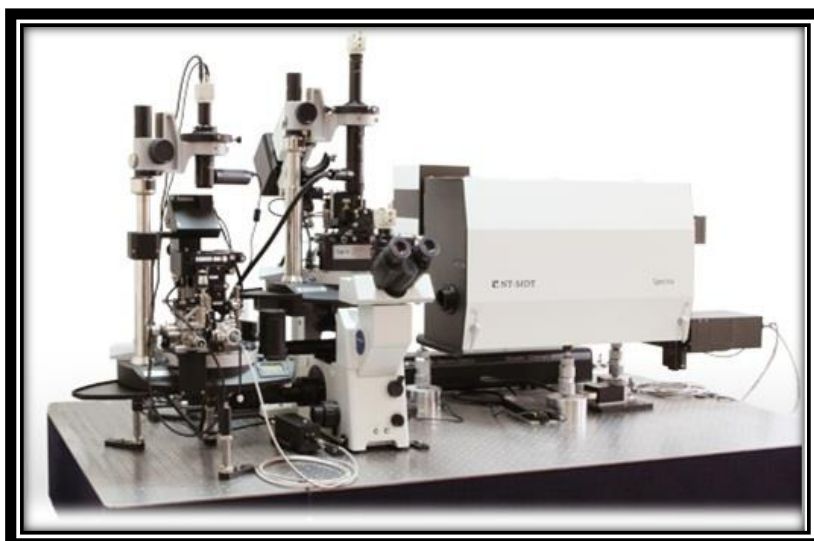


Рис. 3.3.3 Общий вид установки рамановской микроспектрометрии Интегра Спектра.

С помощью TERS был изучен полиморфизм амилоидных фибрилл, образованных пептидом из белка дрожжей Sup35 в разных pH условиях, высаженных на подложки слюды. На основании полученных ранее данных о рамановских спектрах белков, в работе были сделаны выводы составе аминокислотных остатков, непосредственно, содержащихся в высаженном прионном белке и сформулирован вывод о конформациях образовавшихся амилоидных фибрилл [34]. С помощью SERS также был исследован прионный белок через механизм двойного аптамера с использованием Coomassie brilliant blue R-250 (трифенилметановых краситель, используемый для окраски белков) в качестве нового поверхностно-усиленного зонда. Этот метод показал большой потенциал для включения реакции SERS путем специфического распознавания аптамеров антиприона в отношении к сортировочному белку с участием дешевого красителя Coomassie brilliant blue R-250 [48]

В данной работе по исследованию рамановских спектров агрегатов прионного белка Sup35 с помощью ПУРС предложены другие SERS активные подложки для высаживая на него белка и дальнейшего изучения.

4. Цель работы

Получить изображения мономеров и фибрилл белка Sup35NM при помощи сканирующей туннельной микроскопии (СТМ). При помощи поверхностно-усиленной иголки рамановской спектроскопии (ПУРС) изучить спектр комбинационного рассеяния агрегатов прионного белка Sup35NM.

5. Материалы и методы

Для очистки Sup35NMr использовали плазмиду pET20b-SUP35NM. Этот вектор содержит конструкцию, кодирующую Sup35NMr, присоединенную к His6-метке под контролем индуцибельного промотора T7. Для очистки белка использовали штамм BL21 Escherichia coli. Нарботку рекомбинантных белков проводили в среде 2TYa с 1 mM IPTG. Культуры выращивали при 37 °C в течение 6 часов. Протеины были очищены в денатурирующих условиях (в присутствии 8 M мочевины). Была выполнена двухэтапная процедура очистки с колонками Ni-NTA агарозы (Invitrogen) и Q-сефарозы (GE Healthcare). Белки концентрировали с использованием Centricon (30 кДа, Millipore). Для получения агрегатов Sup35NMr белки разбавляли по меньшей мере в 100 раз в буфере для сборки фибрилл (5 mM фосфат калия, pH 7,4, содержащий 150 mM NaCl) до конечной концентрации белка 0,5 мг / мл. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов. В этих условиях Sup35NMr спонтанно агрегировался. После чего приготовленные раствор белка был заморожен.

Для исследования агрегатов прионного белка Sup35 были приготовлены различные подложки, на которые был высажен прионный белок. Для каждого метода исследования они были разные и способ их приготовления описан непосредственно в главе результаты и их обсуждения. Образцы готовились путем нанесения 0,5 µg/ml раствора белка на подложку с последующим промыванием дистиллированной водой и продуванием под струей воздуха.

Во всех исследованиях использовался один и тот же раствор прионного белка, с одинаковой концентрацией, и высаживался одинаковыми методами.

Во всех исследованиях с помощью АСМ, СТМ и ПУРС был использован, описанный выше раствор белка.

Используемые программные обеспечения для анализа в ходе проведения работы:

- 1) NanoScope Analysis 1.50 - для анализа изображений, полученных с помощью АСМ.
- 2) WSxM 5.0 Develop 8.4 - для анализа изображений, полученных с помощью СТМ и АСМ
- 3) Nova P_x 3.2.5 - для анализа изображений и спектров, полученных с помощью ПУРС.
- 4) Origin Pro 2015 использован для построения ПУРС спектров и их анализа.

6. Результаты и их обсуждение

6.1 Исследования с помощью АСМ и СТМ

Первый этап работы состоял в приготовление подложек для АСМ и СТМ. На слюду и на кремний ровным слоем на установке «TORR» (система подготовки образцов для сканирующей микроскопии) было напылено атомарное золото, толщина покрытия составляла 50 нм. Образец помещался в камеру прибора «TORR» над резистивным испарителем с золотом. После этого в камере создавался высокий вакуум, нужный для получения равномерного слоя металла. Далее происходил нагрев резистивного испарителя, путем пропускания через него электрического тока. Температура нагрева достигала той степени, когда верхние слои золота испарялись на образец слой за слоем.

Запыление поверхностей слюды и кремния были проведены в ресурсном центре «Нанотехнологии» Санкт-Петербургского государственного университета физического факультета кафедры «Электроники твердого тела».

Раствор белка был разморожен при комнатной температуре и высажен на каждые подготовленные подложки. Концентрация, способ приготовления и методы высаживания указаны в главе «материалы и методы».

Для того, чтобы убедиться в наличии агрегатов белка Sup35 на запылённых золотом поверхностях кремния и слюды, данные образцы были исследованы при помощи АСМ. АСМ использовался для визуализации поверхности изучаемых образцов так, как у данного вида микроскопа есть большое преимущество: на нем возможно изучать как проводящие, так и непроводящие поверхности.

На рис. 6.1.1 и 6.1.2 представлены полученные изображения, полученные с помощью атомно-силового микроскопа, которые подтвердили наличие на поверхностях кремния и слюды, запыленных золотом, фибриллярных агрегатов белка. Изучение этих образцов происходило при комнатной температуре. Было установлено, что не весь мономерный белок агрегировал, часть его осталась на поверхности образца. На рис. 6.1.3 и 6.1.4 представлены высотные профили для выделенных участков на рис. 6.1.1 и 6.1.2. На основании этих данных высоты фибрилл составляют от 3 до 6 нм.

Полученные изображения на атомно-силовом микроскопе:

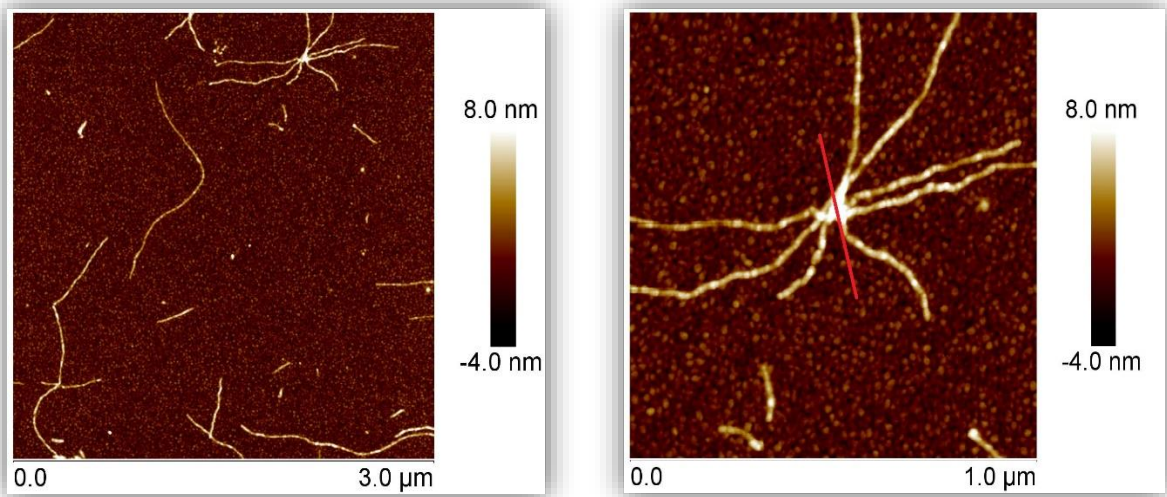


Рис. 6.1.1 Изображения фибрилл и мономерного белка на слюде, полученные с помощью АСМ

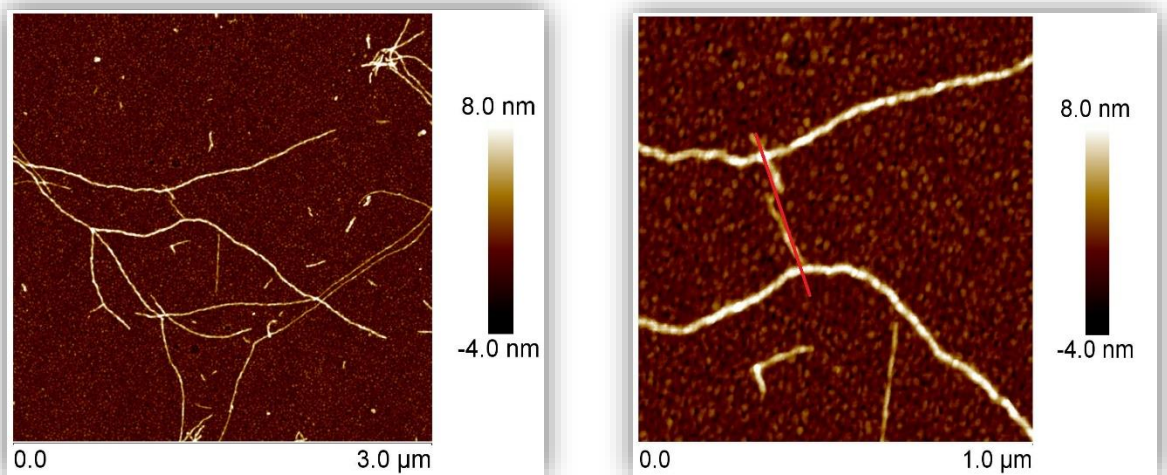


Рис. 6.1.2 Изображения фибрилл и мономерного белка на кремнии, полученные с помощью АСМ

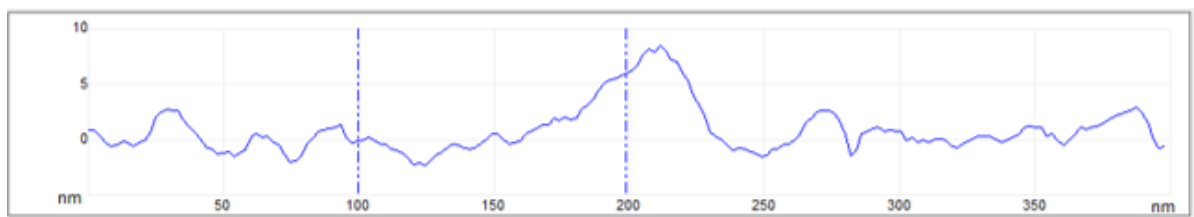


Рис. 6.1.3 Высотные профиль, соответствующий линии красного цвета на рис. 6.1.1



Рис. 6.1.4 Высотные профиль, соответствующий линии красного цвета на рис. 6.1.2

Далее образцы, исследованные с помощью АСМ, были изучены с помощью сканирующего туннельного микроскопа. При изучении поверхности образцов с помощью СТМ найти фибриллы или мономерный белок на поверхности не удалось. На каждой подложке были просканированы различные участки, но положительных результатов так и не было достигнуто. Часть изображений, представлена на рис. 6.1.5 для кремния и 6.1.7 для слюды. На рис. 6.1.6 и 6.1.7 представлены высотные профили на кремниевой подложке и подложки слюды. Высотные профили были получены для выделенных участков на СТМ изображениях с помощью программы WSxM 5.0 Develop 8.4 для анализа изображений, полученных с помощью сканирующего туннельного микроскопа.

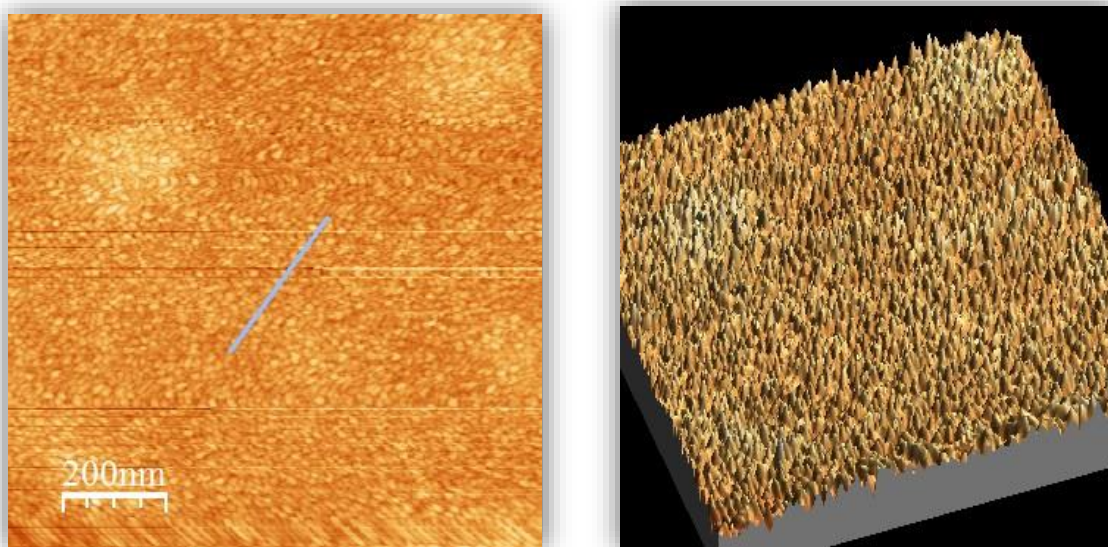


Рис. 6.1.5 2D и 3D изображения на кремнии, полученные с помощью СТМ.

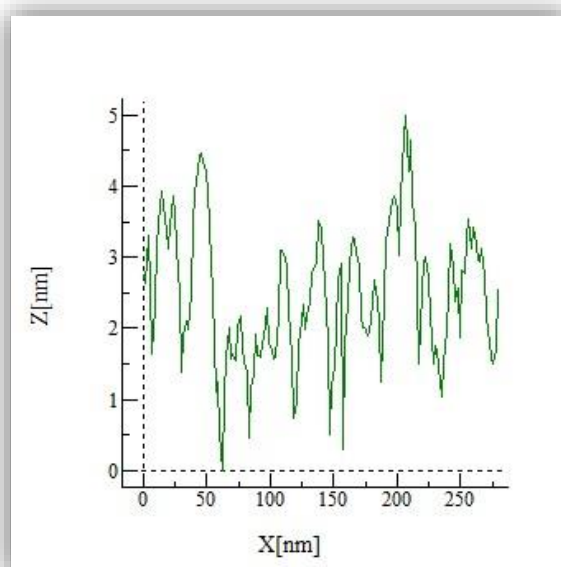


Рис. 6.1.6 Высотный профиль, соответствующий голубой линии на рис. 6.1.5

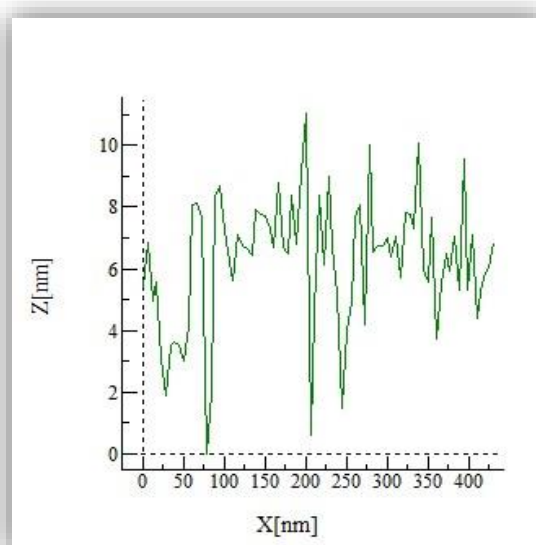
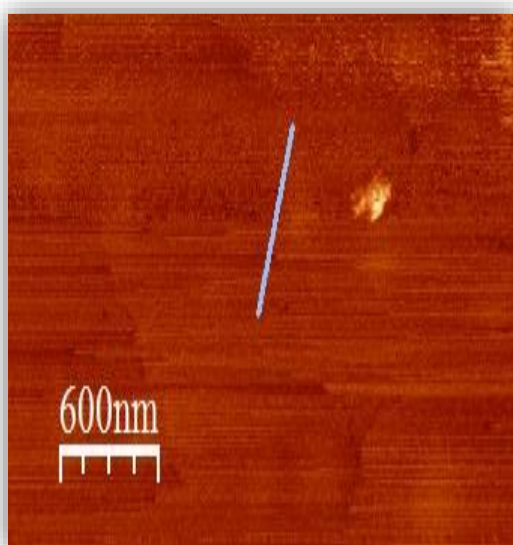


Рис. 6.1.7 Изображение, полученное с помощью СТМ на слюде и высотный профиль, соответствующей голубой линии

Также были исследованы с помощью СТМ образец ВОПГ (высокоориентированный пиролитический графит) с высаженными на него раствором белка. Концентрация, способ приготовления и методы высаживания указаны в главе «материалы и методы». На рис. 6.1.8 и 6.1.9 представлены изображения, полученные с помощью АСМ, а также их 3D изображения на рис. 6.1.10. Как видно из данных представленных на рис. 6.1.11 высота фибрилл составляла от 4 до 6 нм.

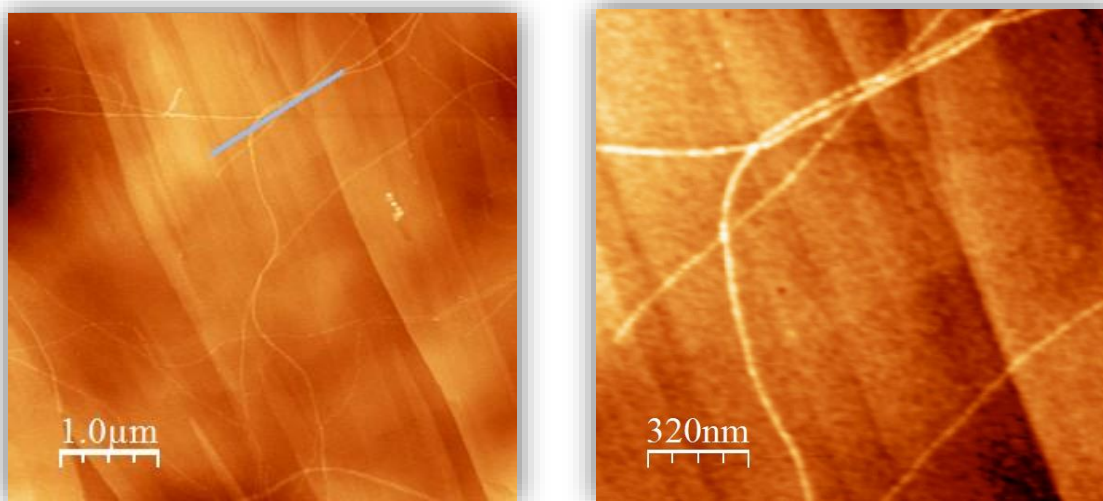


Рис. 6.1.8 Изображения фибрилл, полученные с помощью АСМ, на подложке ВОПГ

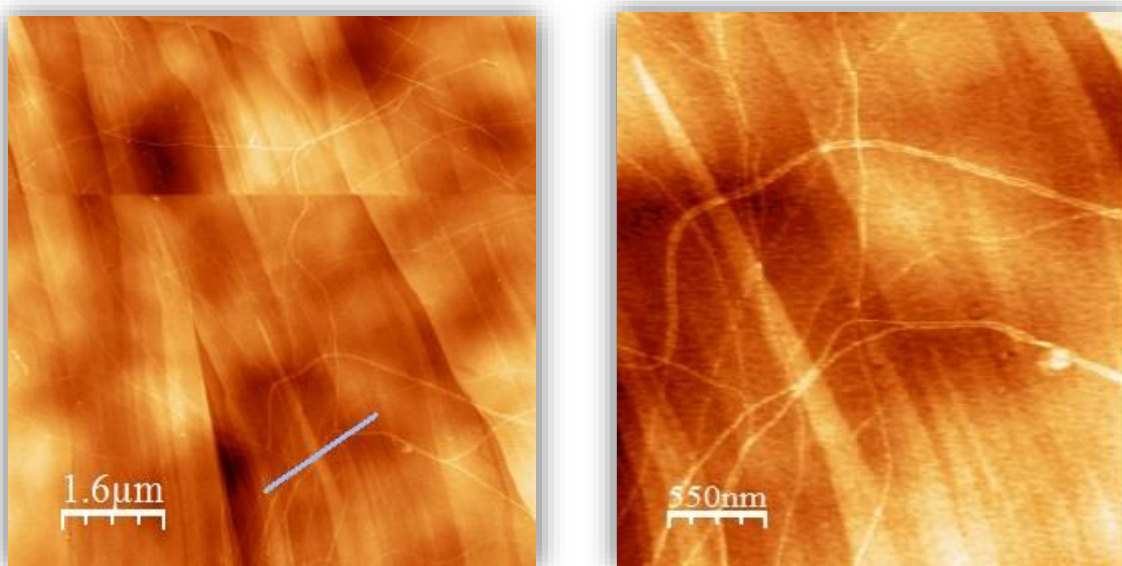


Рис. 6.1.9 Изображения фибрилл, полученные с помощью АСМ, на подложке ВОПГ

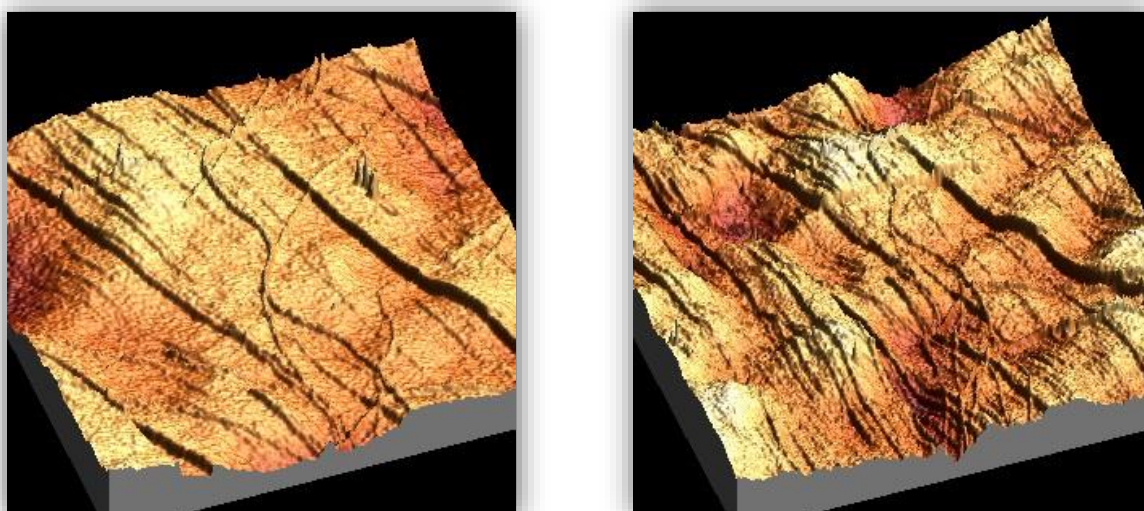


Рис. 6.1.10 3D изображения фибрилл, полученные с помощью АСМ, на подложке ВОПГ

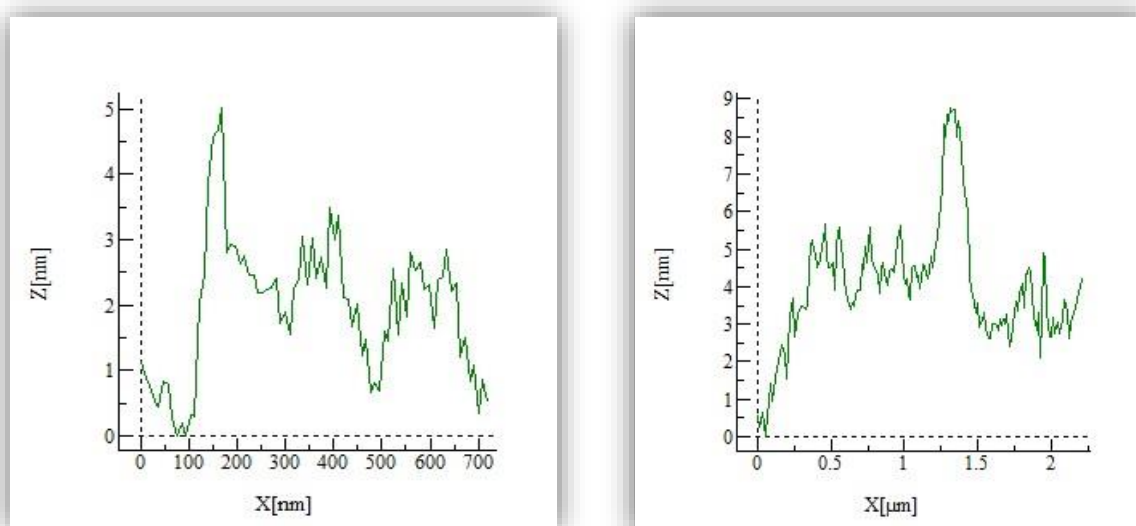


Рис. 6.1.11 Высотные профили, соответствующие выделенным голубым линиям на рис. 6.1.8 и 6.1.9

На рис. 6.1.12 представлены изображения, полученные с помощью СТМ на подложке ВОПГ. Фибрилл и мономерного белка с помощью сканирующего-туннельного микроскопа не удалось обнаружить, как и в случае с запыленными золотом подложками кремния и слюды.

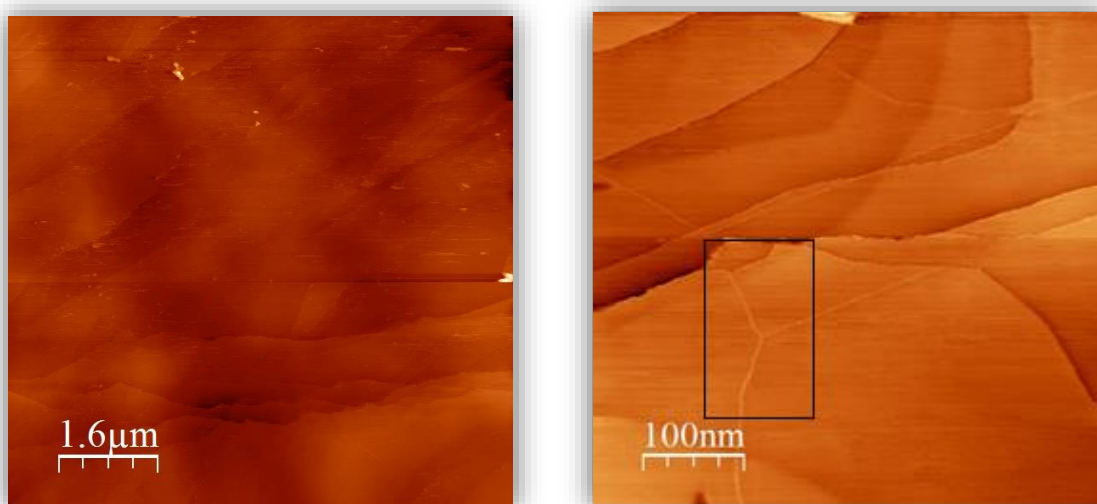


Рис. 6.1.12 Изображения, полученные с помощью СТМ, на подложке ВОПГ

Стоит отметить, что на изображении на рис. 6.1.12 имеются «Y»-образные объекты, которые напоминают фибриллы, полученные с помощью АСМ. Однако, как следует из представленных данных на рис. 6.1.13, они не удовлетворяют размерам фибрилл, исследованных с помощью АСМ. Высоты снятых объектов очень малы, по сравнению с высотами фибрилл.

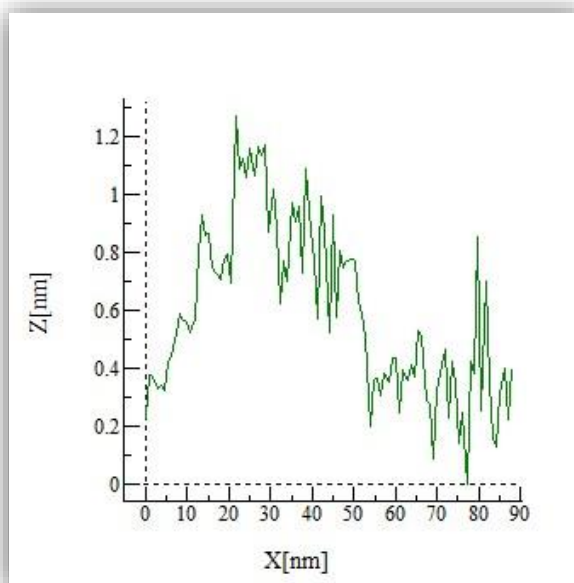


Рис. 6.1.13 Высотный профиль, соответствующий выделенному на рис. 6.1.12 «Y»-образного объекту

Для того, чтобы улучшить проводящие свойства исследуемых образцов, на используемые ранее подложки кремния, запыленные золотом и содержащие фибриллы, и мономерный белок (на основании данных полученных с помощью АСМ), был запылен еще один слой в 1 нм золотого покрытия на установке «TORR». Образец был также исследован с помощью сканирующего-туннельного микроскопа. Полученные СТМ изображения имели схожую картину с изображения без дополнительного напыления. На рис. 6.1.14 представлено изображение, полученное с помощью СТМ. На данном участке образца были найдены объекты высота, которых была сходной с высотой фибрилл, полученных с помощью АСМ. На рис. 6.1.15 представлен высотный профиль выделенного участка. Но визуализировать данные объекты с помощью сканирующей туннельной микроскопии не удалось.

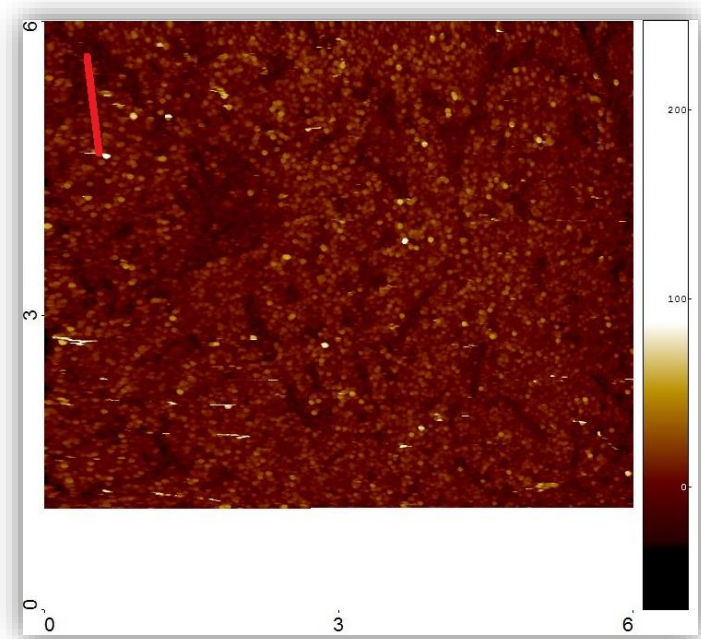


Рис. 6.1.14 Изображение, полученное с помощью СТМ, на запыленной кремниевой подложке, с дополнительным напыление золота толщиной 1 нм на агрегаты белка.

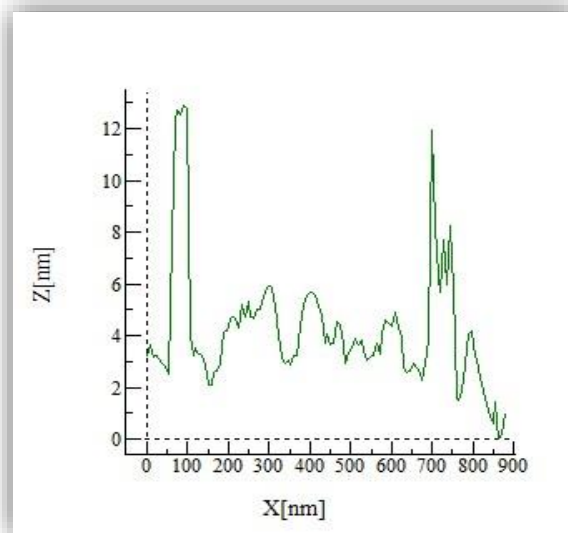


Рис. 6.1.15. Высотный профиль, соответствующий красной линии на рис. 6.1.14

Таким образом, с помощью сканирующего туннельного микроскопа не было получено изображение с агрегатами прионного белка Sup35.

Возможные причины:

- Органические вещества относятся к непроводящим, агрегаты прионов не исключение. Не смотря на, то, что подготовленные подложки имели хорошую электрическую проводимость, возникающий туннельный ток между образцом и подложкой был не достаточным, при сканировании фибрилл, поэтому визуализировать их с помощью СТМ не удалось.
- Фибриллы имеют крупные размеры, судя по данным, полученными с помощью АСМ. Одной из причин может также являться то, что иголка сканирующего-туннельного микроскопа либо сдвигала, либо сметала фибриллу по поверхности, тем самым возя ее за собой.
- Исследования стоило провести не только в вакууме, но и при комнатной температуре или в жидкой среде для того, чтобы увеличить проводящую способность агрегатов. Но Модуль Omicron в котором реализованы методы сканирующей туннельной микроскопии работает только в вакуумных условиях.

6.2 Исследования с помощью ПУРС

В начале исследований были подготовлены специальные подложки. На стекла разной толщины и разной степени шероховатости стеклянной поверхности на установке «Gatan Pecs» (система подготовки образцов для сканирующей микроскопии) было напылено неровным слоем атомарное золото. Толщина золотого покрытия составляла 50 нм. Образец закрепляется на держателе и помещается в камеру установки, в которой находится мишень из золота. После чего в камере создается высокий вакуум. С помощью ионных пушек атомы золота выбиваются из мишени и осаждаются на образец, образуя на нем неравномерный слой.

Для исследований на поверхностно-усиленной иголки рамановской спектроскопии (ПУРС) на подготовленные подложки был высажен белок. Концентрация, способ приготовления и методы высаживания указаны в главе «материалы и методы».

Запыление поверхностей стекол были проведены в ресурсном центре «Нанотехнологии» Санкт-Петербургского государственного университета физического факультета кафедры «Электроники твердого тела».

Для того, чтобы убедиться в наличии высаженных агрегатов на запыленных золотом стеклянных поверхностях, были также проведены исследование с помощью атомно-силового микроскопа.

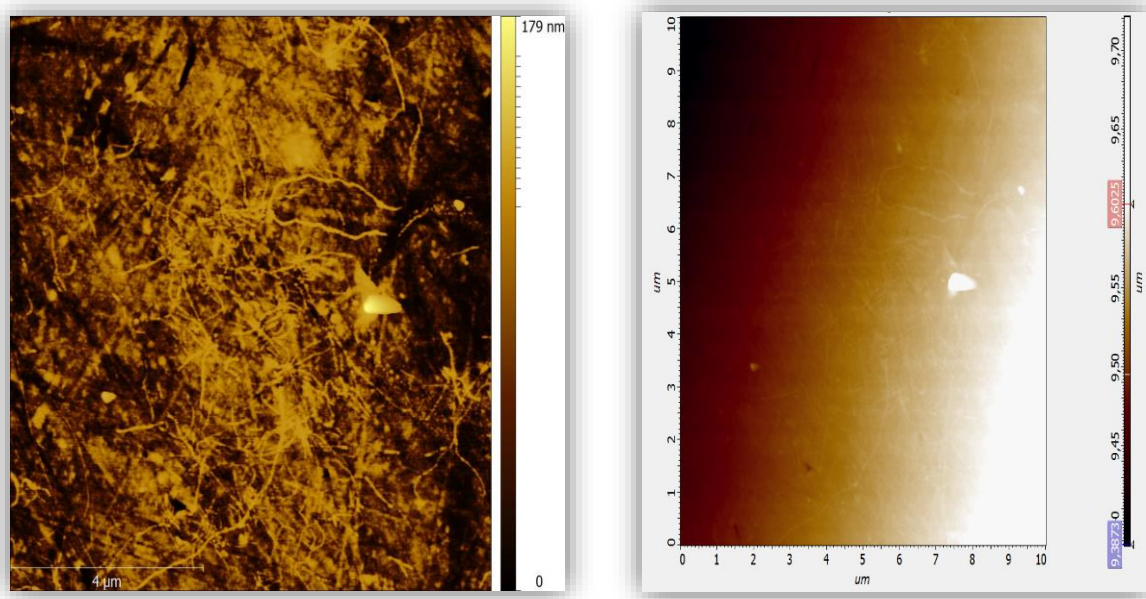


Рис. 6.2.1 Изображения фибрилл, полученных с помощью АСМ на стекле, запыленном золотом

На рис. 6.2.1. представлены изображения, полученные с помощью АСМ на запыленном золотом стекле. На них видно образовавшиеся фибриллы-длинные нитивидные структуры.

С помощью ПУРС исследованы различные участки поверхностей этих образцов. На рис. 6.2.2 представлено одно из изображений исследуемого участка поверхности образца, полученного с помощью рамановской спектроскопии. На этом участке был установлен рамановский спектр самого стекла, запыленного золотом. TERS/SERS активные точки, засвеченные на этом участке поверхности, не являются агрегатами высаженного белка. На рис. 6.2.3 представлен спектр, данного участка поверхности.

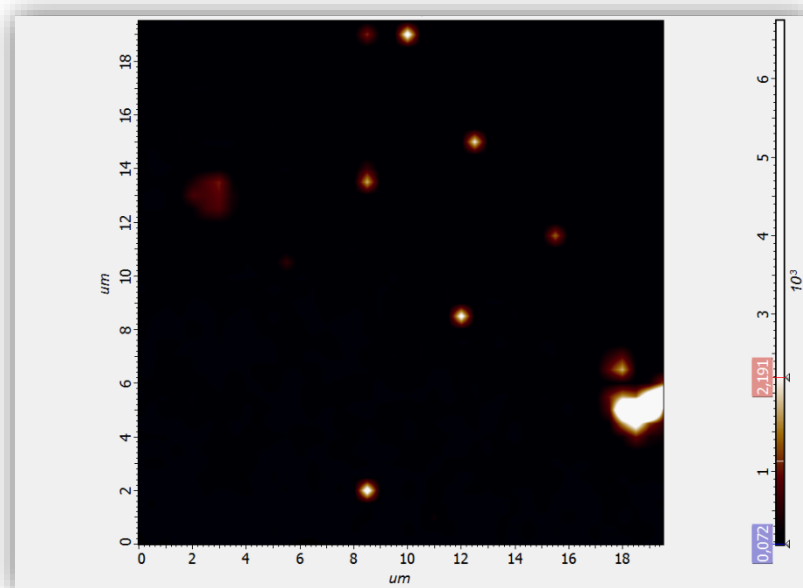


Рис. 6.2.2. Спектр поверхности стекла с напыленным слоем золота.

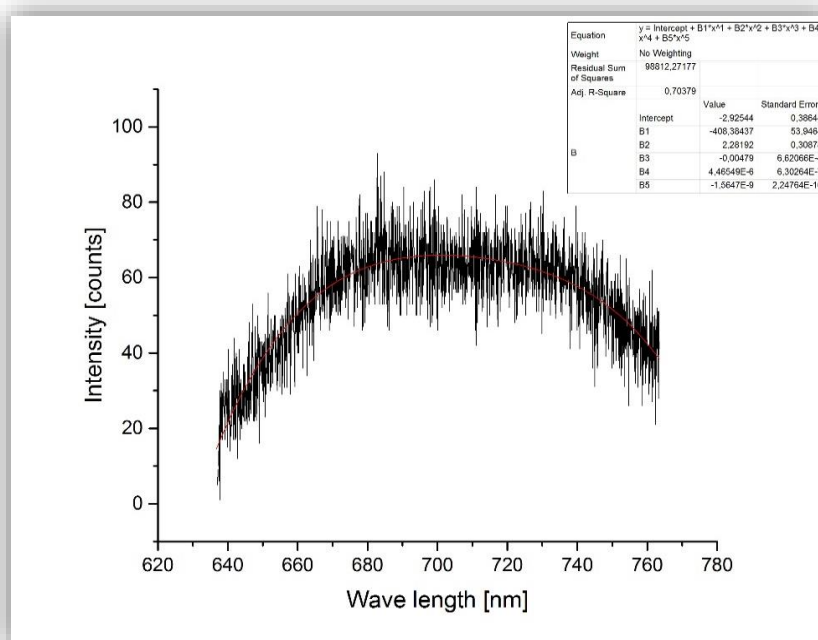


Рис. 6.2.3 Рамановский спектр поверхности стекла, запелынного золотом,

После определения спектра поверхности образца не содержащих агрегатов белка Sup35, были исследованы и другие участки образцов. В ходе изучения и при сравнении со статьей Любченко Ю. Л., Краснослободцев А. В. и др. об исследовании коротких фрагментов прионного белка Sup35 с помощью TERS [34] были выявлены характерные рамановские спектры фибрилл.

На рис. 6.2.4 представлены 2D и 3D изображения, исследуемого участка поверхности стекла, запыленного золотом. В сравнении с указанной выше статьей и полученными в ней результатами, которые представлены на рис. 6.1.5, на данном участке был обнаружен рамановский спектр фибриллы.

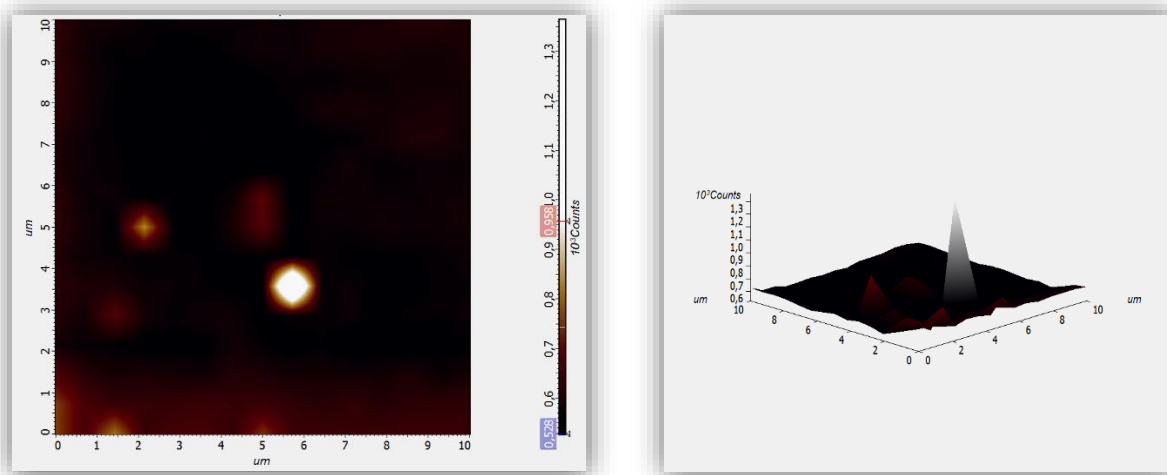


Рис. 6.2.4 2D и 3D изображения, исследуемого участка поверхности стекла, запыленного золотом

На рис. 6.2.6 представлены результаты из статьи Любченко Ю. Л., Краснослободцев А. В из 10 спектров, измеренных вдоль фибриллы. На рис. 6.2.5 спектры TERS для фибрилл, образованных в ацетатном буфере (А) и pH 2 (В). Стрелками показаны положения полос комбинационного рассеяния для тирозина (Y) и цистеина (C). На рис. 6.2.7 представлен рамановский спектр фибриллы, полученный нами.

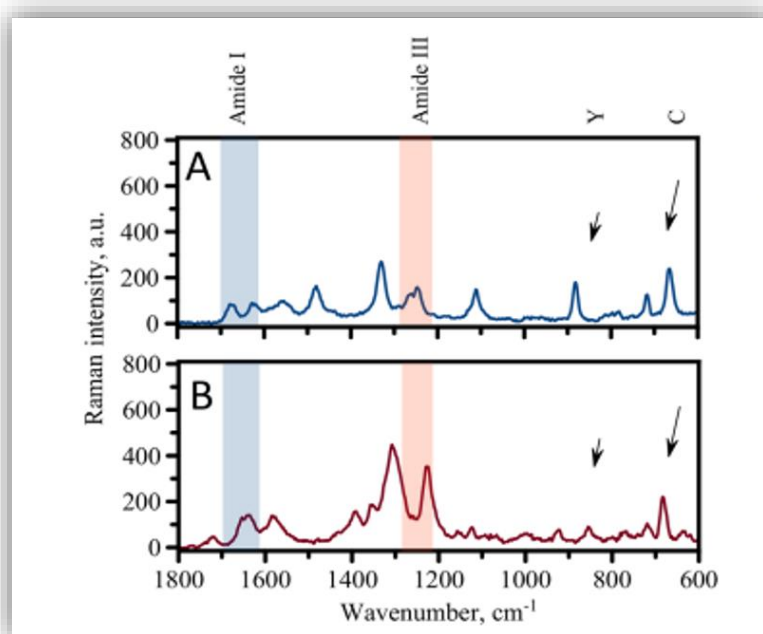


Рис. 6.2.5 Спектры TERS для фибрилл, образованных в ацетатном буфере (A) и pH 2 (B).
Стрелками показаны положения полос комбинационного рассеяния, назначенные тирозину (Y) и цистеину (C) [34]

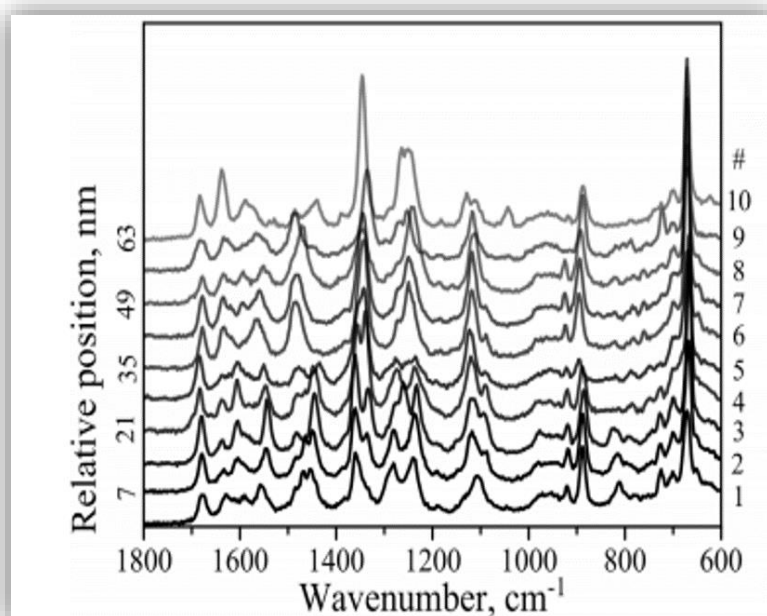


Рис. 6.2.6 Десять последовательных спектров TERS, измеренных вдоль сформированной фибриллы [34]

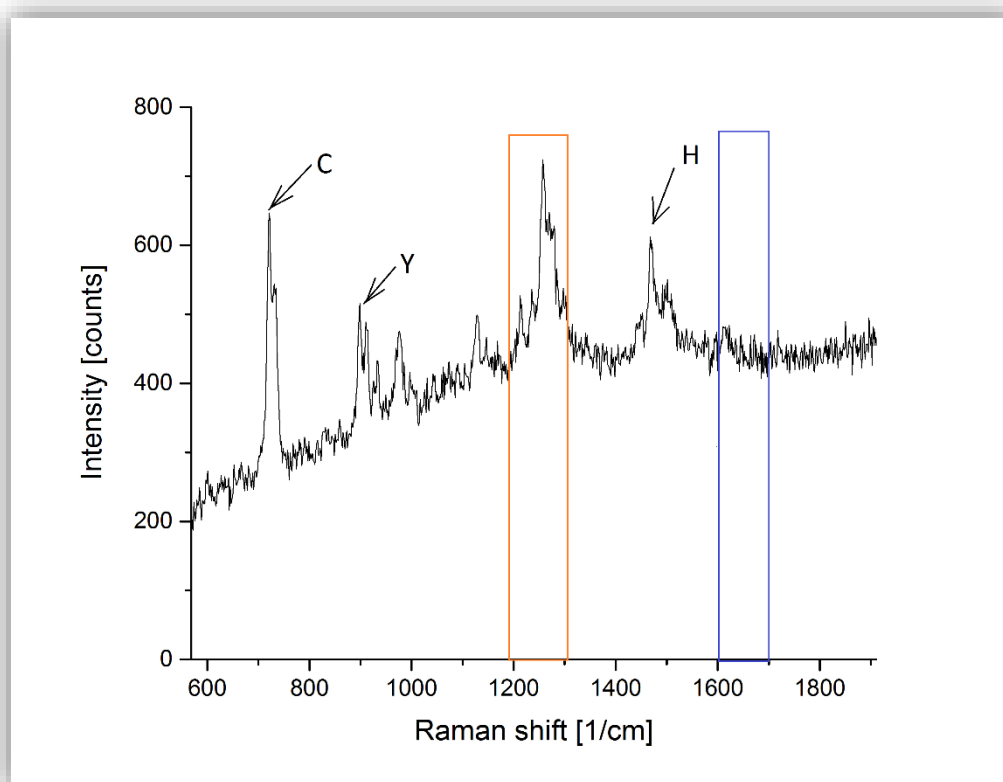


Рис. 6.2.7 Рамановский спектр фибриллы исследуемого участка стекла, запыленного золотом. Красным выделена область амида III, а синим область амида I

Спектр имеет хорошо выраженные пики в нескольких областях. В нем можно идентифицировать и выделить несколько характерных комбинационных полос. Одна часть полос соответствует сигналам от аминокислот [40]. Можно выделить полосу комбинационного рассеяния цистеина (C), тирозина (Y) и гистидина (H) так, как эти аминокислоты имеют специфические спектральные характеристики (их спектральные линии отмечены стрелочками). Выделение полос для аминокислотных остатков основывалось на результатах, полученных для состава и строения фибрилл инсулина [26]. На рис. 6.2.8 и 6.2.9 представлены результаты данной работы по определению комбинационных спектров для различных аминокислот и состав их вторичной структуры.

Другая часть сильных сигналов наблюдалась в областях, специфичных для амидных полос пептидной цепи. Амидные полосы считаются сигнатурами,

которые характеризуют конформацию пептида [42]. Регионы амида I или амида III используются для оценки вторичной структуры, в зависимости от природы аминокислотных остатков. Регион амида III расположен в областях 1200-1300 1/см, а амида I в 1600-1700 1/см [37]. Спектр, показанный на рис. 6.2.6, имеет три пика при 1256 1/см (бета-лист), 1269 1/см (неупорядоченная структура) и 1279 1/см (α -спираль) в области амида III [34]. Таким образом сформированные фибриллы, состоят из смеси конформаций, основываясь на использовании полосы амида III для структурной характеристики в амилоидных фибриллах и природе аминокислотных остатков. Вторичные структуры, анализируемые с помощью поверхностно-усиленной угловой рамановской спектроскопии, предпочтительно представляют собой вклад от фибриллярной поверхности, а не фибриллярного ядра, где, как ожидается, доминирует β -лист. В области амида I явных пиков не обнаружено. Сложно различить β -лист от неупорядоченной структуры в области амида I. Недавние сообщения показали, что полоса амида I чувствительна к природе аминокислотных остатков и может эффективно подавляться в TERS и SERS [36].

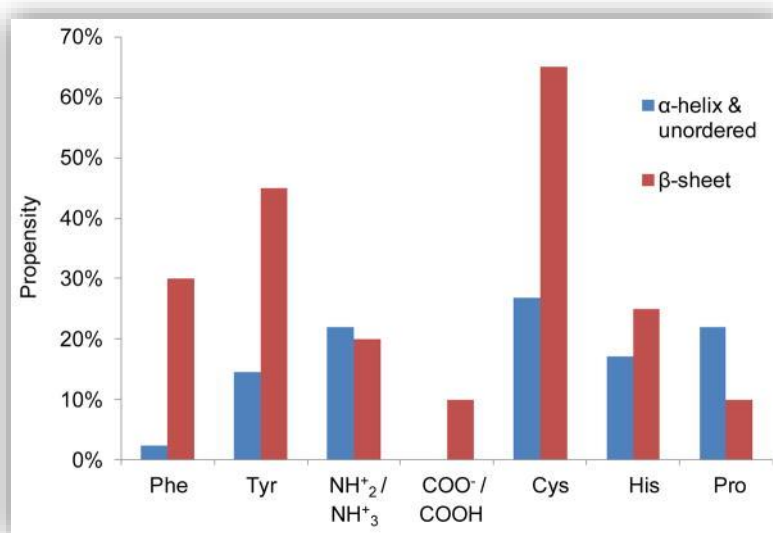


Рис 6.2.8 Относительное процентное содержание в аминокислотных остатках β -листов (красный) и α -спиралей или неупорядоченных (синий) структур.

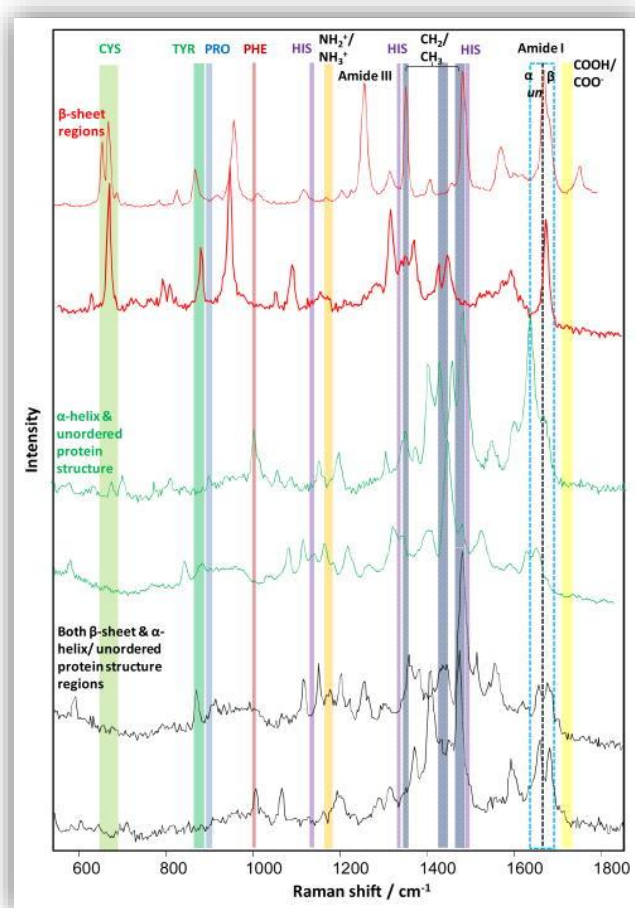


Рис. 6.2.9 TERS спектры аминокислотных остатков фибриллы инсулина. Амиды I и III отмечены пунктирными линиями, показывающие границы между вторичной структуры белка [26].

В подтверждении химического состава и конформаций сформированных фибрилл раствор белка с был также на стеклянные подложки напыленные серебром с выращенными на них наночастицами. Подложки были предоставлены биологическим факультетом СпбГУ. Концентрация, способ приготовления и методы высаживания указаны в главе «материалы и методы».

С помощью ПУРС были исследованы различные участки данных образцов.

На рис. 6.2.10 представлено изображение участка исследуемой поверхности стекла, запыленного серебром.

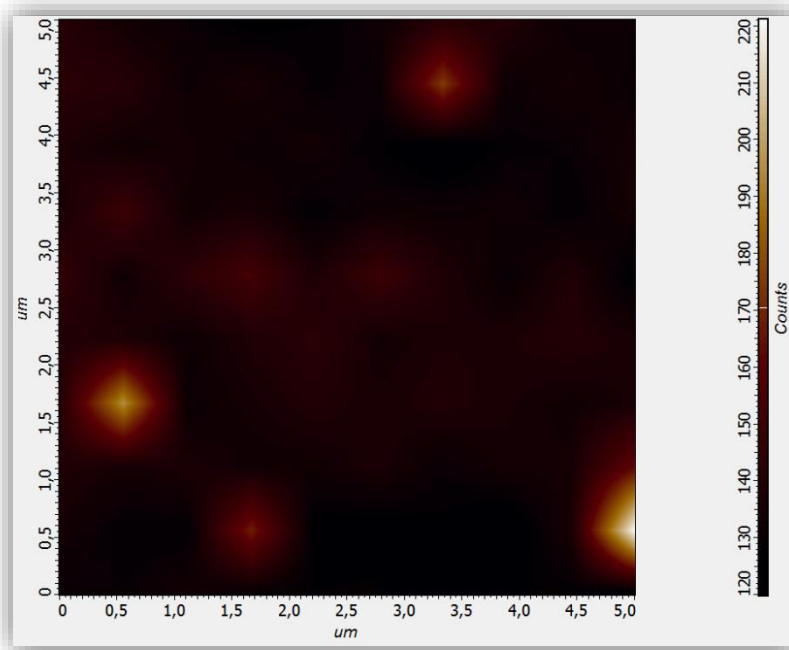


Рис. 6.2.10 2D спектр стекла напыленным сверху серебряным слоем

TERS/SERS активные точки, засвеченные на этом участке поверхности, не являются агрегатами высаженного раствора белка Sup35. На рис. 6.2.11 представлен рамановский спектр данного участка образца, построенный в программе Origin Pro 2015.

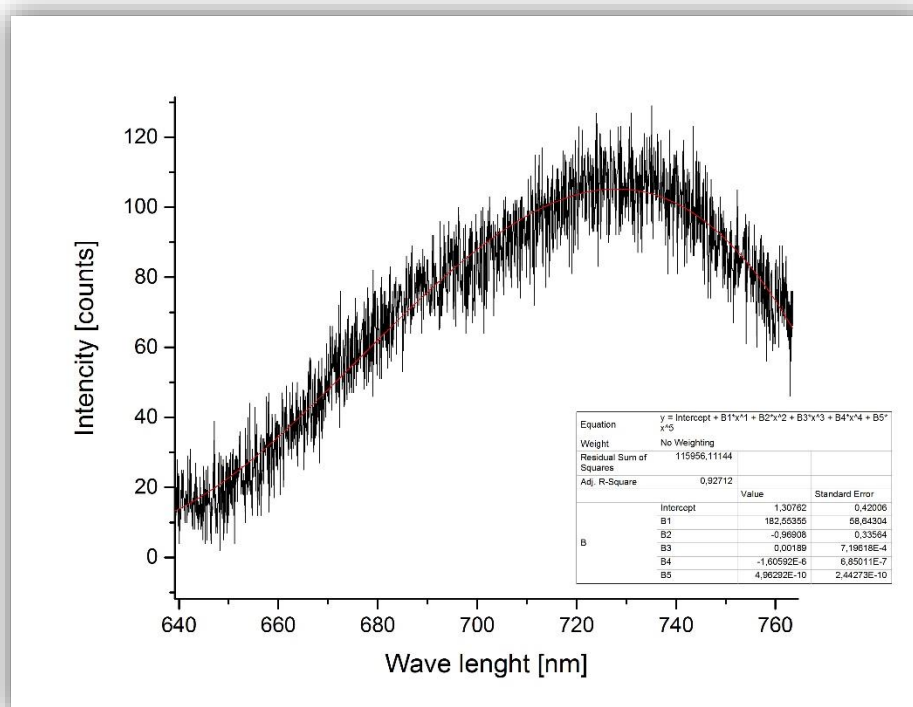


Рис 6.2.11 Рамановский спектр участка поверхности стекла, запыленного серебром

После оценки комбинационного спектра стеклянной поверхности, запыленной серебром, были исследованы участки, содержащие фибриллы. Анализ комбинационных спектров фибрилл проводился аналогично, как и с образцами стекла, запыленных золотом. На рис.6.2.12 представлено изображение участка образца, на котором был обнаружен рамановский спектр фибриллы.

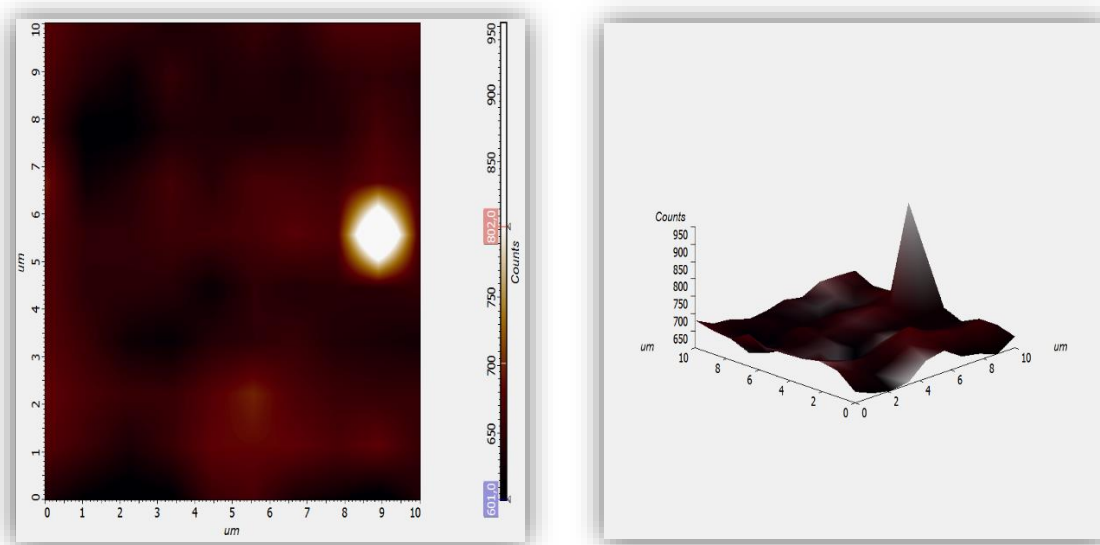


Рис. 6.2.12 2D и 3D изображения участка исследуемого образца с фибриллами на поверхности стекла, запыленного серебром

На рис. 6.2.13 представлен рамановский спектр фибриллы, обнаруженный на поверхности участка стекла, запыленного серебром.

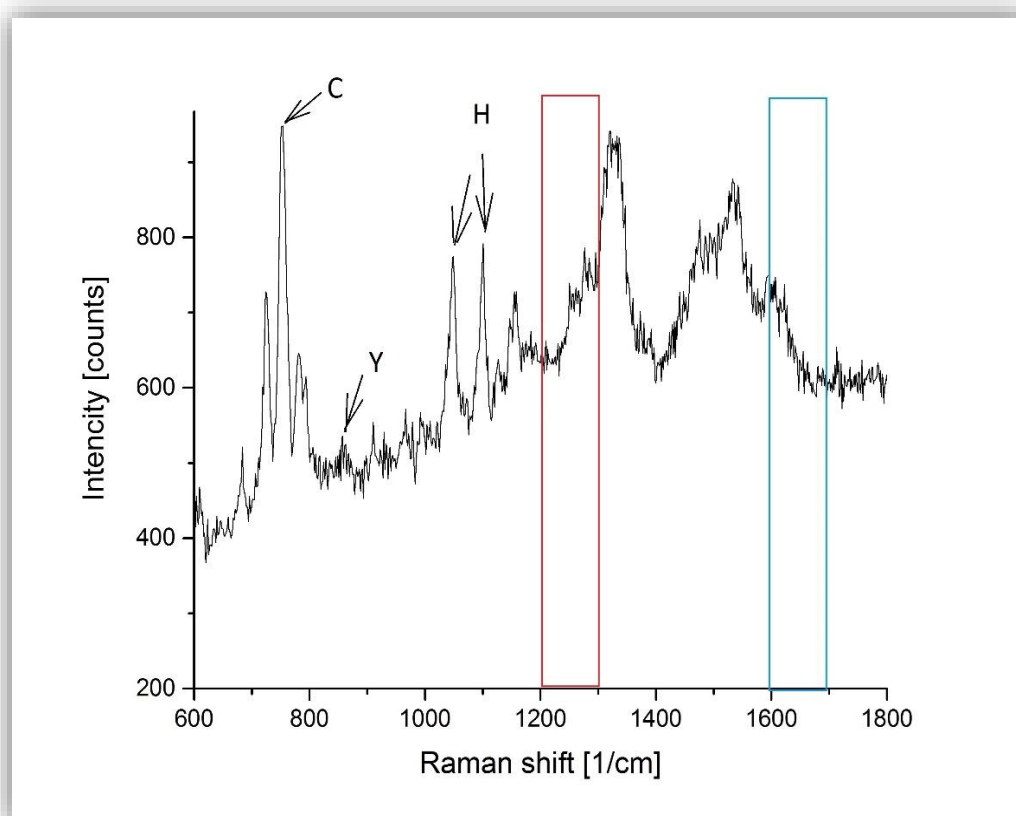


Рис 6.2.13 Рамановский спектр фибриллы на поверхности стекла, напыленного серебром. Красным выделена область амида III, а синим область амида I.

Спектр имеет хорошо выраженные пики в нескольких областях. В данном спектре можно идентифицировать и выделить несколько характерных комбинационных полос. Хорошо видны спектральные линии цистеина (C), а также тирозина (Y) и гистидина (H) (отмечены стрелочками). Анализ проводился на основании работ, используемых выше. Регионы амида I или амида III используются для оценки вторичной структуры. Регион амида III расположен в областях 1200-1300 $1/\text{см}$, а амида I в 1600-1700 $1/\text{см}$ [37]. Спектр, показанный на рис. 6.2.13, имеет три пика 1297 $1/\text{см}$ (α -спираль), 1252 $1/\text{см}$ (неупорядоченная структура) и 1211 (β -лист) $1/\text{см}$ в области амида III. Таким образом фибриллы состоят из набора конформаций, основываясь на использовании полосы амида III для структурной характеристики в амилоидных фибриллах и природе аминокислотных остатков. В области

амида I пик в 1623 1/см, что соответствует β -слою. Поэтому можно сделать вывод, что в сформированной фибрилле преобладают β -структуры.

Выводы

- АСМ изображения показали наличие агрегатов: фибрилл и мономерного, высаженного прионного белка Sup35 на подложки кремния и слюды, запыленных золотом и на ВОПГ.
- На основании полученных АСМ изображений и их анализе, был найден диапазон высот сформированных фибрилл.
- С помощью сканирующей туннельной микроскопии (СТМ) изображений агрегатов на тех же образцах, которые были исследованы с помощью АСМ, не было найдено.
- Были получены с помощью ПУРС характерные рамановские спектры фибрилл на разных подложках: стекло, запыленное золотом и стекло, запыленное серебром.
- На основании полученных рамановских спектров был сделан анализ о наборе конформаций сформированных фибрилл и о составе аминокислотных остатков.

Список используемой литературы:

1. Зуев В.А. Прионы – возбудители медленных инфекций человека и животных // РМЖ. 2010. №6.
2. Григорьев В. Б. Прионные болезни человека и животных // Вопросы вирусологии. — 2004. — Т. 49, № 5.
3. Krull, Ira S.; Brian K. Nunnally. Prions and mad cow.
4. И. С. Шкундина, М. Д. Тер-Аванесян. Прионы. Успехи биологической химии, т. 46, 2006.
5. Chandler, R.L. (1961) Lancet, 1, 1378–1379.
6. S. B. Prusiner. Prion biology and diseases.
7. Prusiner, S.B., Garfin, D.E., Cochran, S.P., Baringer, J.R., Hadlow, W.J., Eklund, C.M., and Race, R.E. (1978) Trans. Am. Neurol. Assoc., 103.
8. Prusiner, S.B. (1991) Science, 252, 1515–1522
9. Kushnirov, V.V., and Ter-Avanesyan, M.D. (1998) Cell.
10. Doel, S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R., and Cox, B.S. (1994) Genetics.
11. Bradley, M.E., and Liebman, S.W. (2004) Mol. Microbiol.
12. Glover et al., 1997; King and Diaz-Avalos, 2004; Paushkin et al., 1997; Tanaka Et al., 2004.
13. В. Л. Миронов, (2004) Основы сканирующей зондовой микроскопии. Учебное пособие.
14. A. V. Krasnoslobodtsev, T. Deckert-Gaudig, Y. Zhang, V. Deckert, Y.L. Lyubchenko, Ultramicroscopy (2016) Polymorphism of amyloid fibrils formed by a peptide from the yeast prion protein Sup35: AFM and Tip-Enhanced Raman Scattering studies.
15. Kushnirov, V.V., Kochneva-Pervukhova, N.V., Chechenova, M.B., Frolova, N.S., Ter-Avanesyan, M.D. (2000) EMBO J.
16. Kendra K. Frederick, Galia T. Debelouchina, Can Kayatekin, Tea Dorminy. (2014). Distinct prion strains are defined by amyloid core structure and chaperone binding site dynamics.

17. *Prusiner S.B., McKinley M.P., Groth D.F., Bowman K.A., Mock N.I., Cochran S.P., Masiarz F.R.* (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein.
18. *Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortell, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., Prusiner, S.B.* (1996) *Science*.
19. *Wickner, R.B.* (1994) *Science*, 264
20. *Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B.* (1993) *Bio chemistry*, 32.
21. *Sunde, M., and Blake, C.* (1997) *Adv. Protein Chem.*, 50.
22. *C. Julian Chen* (2008). *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*.
23. *Blackie, Evan J.; Le Ru, Eric C.; Meyer, Matthias; Etchegoin, Pablo G.* (2007). "Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study»
24. *Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E.* (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins
25. *Yasuhiko Fujita, Peter Walke, Steven De Feyter* (2016). Tip-enhanced Raman scattering microscopy: Recent advance in tip production.
26. «Structure and Composition of Insulin Fibril Surfaces Probed by TERS»
D.Kurouski, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, I. K. Lednev
27. *Liebman, S.W., Sherman, F.* (1979) *J.Bacteriol.*
28. *Wickner R.B., Taylor K.L., Edskes H.K., Maddelein M.L.* Prions: Portable prion domains // 56 *Curr. Biol.* 2000.
29. *Kishimoto, A., Hasegawa, K., Suzuki, H., Tagushi, H., Namba, K., Yoshida, M.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
30. *Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.N., Jr, Caughey, B.* (1995) *Nature*, 375.

31. *Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riekel, C., Grothe, R., Eisenberg, D.* (2005) *Nature*
32. *Kajava AV1, Baxa U, Steven AC.* (2010) Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils.
33. *Simons, K., Ehehalt, R.J.* (2002) *Clin. Invest.*, 110.
34. *A. V. Krasnoslobodtsev, T. Deckert-Gaudig, Y. Zhang, V. Deckert, Y. L. Lyubchenko* (2016). Polymorphism of amyloid fibrils formed by a peptide from the yeast prion protein Sup35: AFM and Tip-Enhanced Raman Scattering studies
35. *Cox, B.* (1965) *Heredity*, 20.
36. *D. Kurouski, T Postiglione, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert* (2013) Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens.
37. *T. Deckert-Gaudig, E. Kämmer, V. Deckert* (2012) Tracking of nanoscale structural variations on a single amyloid fibril with tip-enhanced Raman scattering
38. *Kajava V, Baxa U, Wickner R, Steven A.* (2004). A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure
39. *Kushnirov V.V., Alexandrov I.M., Mitkevich O.V., Shkundina I.S., Ter-Avanesyan M.D.* (2006) Purification and analysis of prion and amyloid aggregates.
40. *T. Deckert-Gaudig, E. Bailo, V. Deckert.* (2009). Tip-enhanced Raman scattering (TERS) of oxidised glutathione on an ultraflat gold nanoplate
41. *Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Didichenko, S.A., Chernoff, Y.O., Inge-Vechtomov, S.G., and Smirnov, V.N.* (1993) *Mol. Microbiol.*
42. *Jakobsen, R.J., Brown, L.L., Hutson, T.B., Fink, D.J.,* (1983). Intermolecular interactions in collagen self-assembly as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy

43. *Shewmaker F, Wickner RB, Tycko R.* (2006) Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure
44. *Gajdusek et al., 1957; Hadlow 1959; Klatzo et al., 1976.*
45. *Презентация Кушнирова В. В.* «Амилоидные и прионные заболевания». Из нее были взяты рисунки.
46. *S. A. Bondarev, G.A. Zhouravleva, M. V. Belousov, A. V. Kajava* (2015) Structure-based view on [PSI⁺] prion properties.
47. *Dusan Losic, Lisandra L. Martin, Adam Mechler, Marie-Isabel Aguilar, David H. Small* (2006) High resolution scanning tunnelling microscopy of the α -amyloid protein (A1–40) of Alzheimer's disease suggests a novel mechanism of oligomer assembly.
48. *Ping Ping Hu, Hui Liu, Lei Zhan, Lin Ling Zheng, Cheng Zhi Huang.* (2015) Coomassie brilliant blue R-250 as a new surface-enhanced Raman scattering probe for prion protein through a dual-aptamer mechanism.
49. *Xiaojing Ma, Lei Liu, Xiaobo Mao, Lin Niu, Ke Deng, Weihui Wu, Yanmei Li, Yanlian Yang and Chen Wang* (2009) Amyloid β (1–42) Folding Multiplicity and Single-Molecule Binding Behavior Studied with STM.
50. *Xiaobo Mao, Xiaojing Ma, Lei Liu, Lin Niu, Yanlian Yang, Chen Wang* (2009) Structural characteristics of the beta-sheet-like human and rat islet amyloid polypeptides as determined by scanning tunneling microscopy.
51. *Blackie, Evan J.; Le Ru, Eric C.; Meyer, Matthias; Etchegoin, Pablo G.* (2007). "Surface- Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study»